

# **Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)**

International application number: PCT/JP04/019384

International filing date: 24 December 2004 (24.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP  
Number: 2003-433717  
Filing date: 26 December 2003 (26.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 03 March 2005 (03.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

04.01.2005

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日      2003年12月26日  
Date of Application:

出願番号      特願2003-433717  
Application Number:

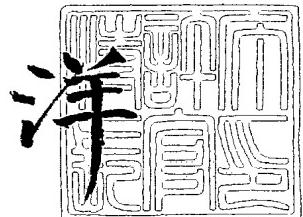
[ST. 10/C] : [JP2003-433717]

出願人      塩野義製薬株式会社  
Applicant(s):

2005年 2月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



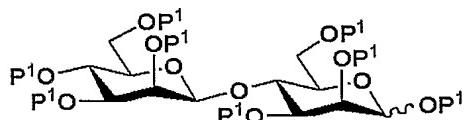
【書類名】 特許願  
【整理番号】 192441  
【提出日】 平成15年12月26日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07H 1/08  
【発明者】  
  【住所又は居所】 北海道札幌市中央区北九条西16丁目1-1-302  
  【氏名】 西村 紳一郎  
【発明者】  
  【住所又は居所】 北海道札幌市東区北十九条東1丁目1-24 足立ビル207号室  
  【氏名】 武川 泰啓  
【特許出願人】  
  【識別番号】 000001926  
  【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号  
  【氏名又は名称】 塩野義製薬株式会社  
【代理人】  
  【識別番号】 100068526  
  【弁理士】  
  【氏名又は名称】 田村 恭生  
  【電話番号】 06-6949-1261  
  【ファクシミリ番号】 06-6949-0361  
【選任した代理人】  
  【識別番号】 100103230  
  【弁理士】  
  【氏名又は名称】 高山 裕貢  
  【電話番号】 06-6949-1261  
  【ファクシミリ番号】 06-6949-0361  
【選任した代理人】  
  【識別番号】 100087114  
  【弁理士】  
  【氏名又は名称】 斎藤 みの里  
  【電話番号】 06-6949-1261  
  【ファクシミリ番号】 06-6949-0361  
【手数料の表示】  
  【予納台帳番号】 223643  
  【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
  【物件名】 特許請求の範囲 1  
  【物件名】 明細書 1  
  【物件名】 要約書 1  
  【包括委任状番号】 9813008

## 【書類名】特許請求の範囲

## 【請求項1】

(1) マンノース $\beta$ -1, 4-結合を有する多糖類を加水分解し、次いで得られた化合物の水酸基を保護することにより、式(I I)：

## 【化1】



(式中、P<sup>1</sup>は水酸基の保護基であり、破線はO P<sup>1</sup>基がアキシアル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるマンノース2糖 (ManP<sup>1</sup> $\beta$ 1→4ManP<sup>1</sup>型) 化合物を製造する工程を含む、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖 (Man $\beta$ 1→4GlcN $\beta$ 1→4GlcN) を製造する方法。

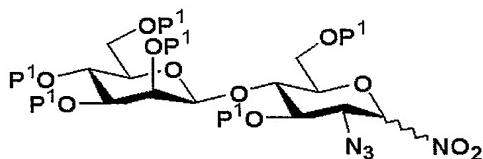
## 【請求項2】

アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖 (Man $\beta$ 1→4GlcN $\beta$ 1→4GlcN) を製造する請求項1記載の方法において、さらに、

(2) 得られたマンノース2糖 (ManP<sup>1</sup> $\beta$ 1→4ManP<sup>1</sup>型) 化合物をハロゲン化し、次いで還元することにより、マンノース2糖化合物における還元末端側のマンノースがグリカールに変換したグリカール化合物とし、次に、

(3) 得られたグリカール化合物をアジドナイトレーション反応に付し、還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエカトリアルに位置する式(I I I)：

## 【化2】



(式中、P<sup>1</sup>は前記と同意義であり、破線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるアジ化2糖 (ManP<sup>1</sup> $\beta$ 1→4ManP<sup>1</sup>型) 化合物を製造する、各工程を含む方法。

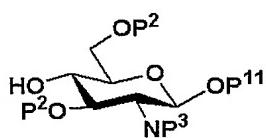
## 【請求項3】

アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖 (Man $\beta$ 1→4GlcN $\beta$ 1→4GlcN) を製造する請求項2記載の方法において、さらに、

(4) 得られたアジ化2糖 (ManP<sup>1</sup> $\beta$ 1→4ManP<sup>1</sup>型) 化合物のニトロ基を脱離基に置換し、次いで

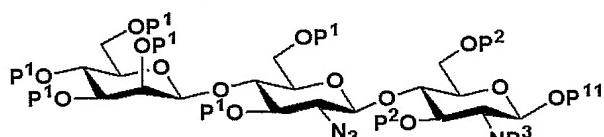
(5) 得られた脱離基導入体に式：

## 【化3】



(式中、P<sup>2</sup>は水酸基の保護基、P<sup>3</sup>はアミノ保護基、P<sup>1</sup>は水酸基の保護基である) で示されるアミノ保護グルコピラノシドを反応させ、式(I V)：

## 【化4】



(式中、P<sup>1</sup>、P<sup>2</sup>、P<sup>3</sup>およびP<sup>1</sup>は前記と同意義)

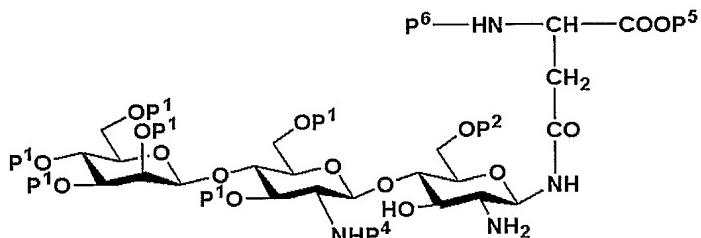
で示される 3 糖 (Man  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcNP<sup>1</sup>  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4GlcNP<sup>2</sup> 型) 化合物を製造する、各工程を含む方法。

#### 【請求項 4】

アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖(Man $\beta$ 1→4GlcN $\beta$ 1→4GlcN)を製造する請求項3記載の方法において、さらに、

(6) 得られた3糖化合物の還元末端に保護アスパラギンを結合させ、式(V)：

〔化5〕



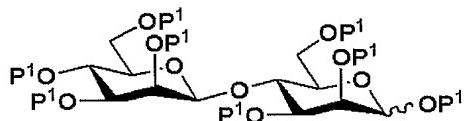
(式中、P<sup>1</sup> および P<sup>2</sup> は前記と同意義、P<sup>4</sup> および P<sup>6</sup> は各々独立してアミノ保護基、P<sup>5</sup> はカルボキシ保護基である)

で示されるアスパラギン結合型3糖( $\text{Man} \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNP}^2$ )化合物を製造する方法。

### 【請求項 5】

マンノース  $\beta$ -1, 4-結合を有する多糖類を加水分解し、次いで得られた化合物の水酸基を保護することにより、式(I I)：

〔化6〕



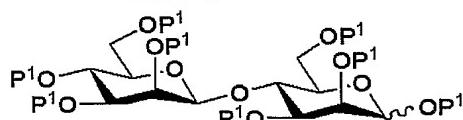
(式中、P<sup>1</sup>は水酸基の保護基であり、破線はOP<sup>1</sup>基がアキシャル配置もしくはエカトル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるマンノース 2 糖 ( $\text{Man}^{\text{P}1} \beta 1 \rightarrow 4 \text{Man}^{\text{P}1}$  型) 化合物を製造する方法。

【請求項 6】

式(II)：

【化7】

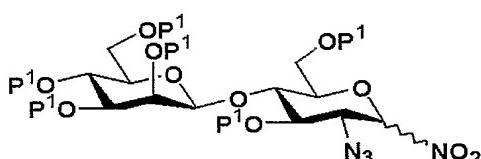


(式中、 $P^1$  は水酸基の保護基であり、破線は  $OP^1$  基がアキシャル配置もしくはエカトリアル配置、または画配置が混在していることを示す)

で示されるマンノース 2 糖 ( $\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4 \text{ManP}^1$  型) 化合物をハロゲン化し、次いで還元することにより、マンノース 2 糖化合物における還元末端側のマンノースがグリカールに変換したグリカール化合物とし、次に、

得られたグリカル化合物をアジドナイトレーション反応に付し、還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエカトリアルに位置する式(I II)：

【化8】



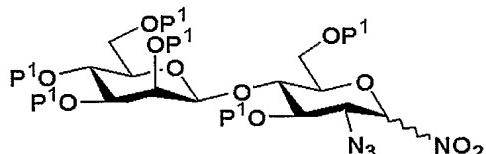
(式中、P<sup>1</sup>は前記と同意義であり、破線はニトロ基がアキシャル配置もしくはエカトリ

アル配置、または両配置が混在していることを示す)  
で示されるアジ化2糖 ( $\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4 \text{ManP}^1$ 型) 化合物を製造する方法。

## 【請求項7】

還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエカトリアルに位置する式 (III) :

## 【化9】

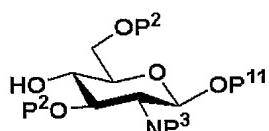


(式中、 $P^1$  は前記と同意義であり、破線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるアジ化2糖 ( $\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4 \text{ManP}^1$ 型) 化合物のニトロ基を脱離基に置換し、次いで

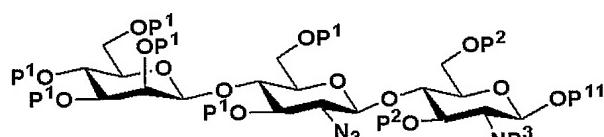
得られた脱離基導入体に式：

## 【化10】



(式中、 $P^2$  は水酸基の保護基、 $P^3$  はアミノ保護基、 $P^{1\ 1}$  は水酸基の保護基である)  
で示されるアミノ保護グルコピラノシドを反応させ、式 (IV) :

## 【化11】

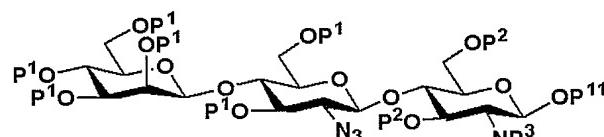


(式中、 $P^1$ 、 $P^2$ 、 $P^3$  および  $P^{1\ 1}$  は前記と同意義)  
で示される3糖 ( $\text{Man} \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNP}^1 \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNP}^2$ 型) 化合物を製造する方法。

## 【請求項8】

式 (IV) :

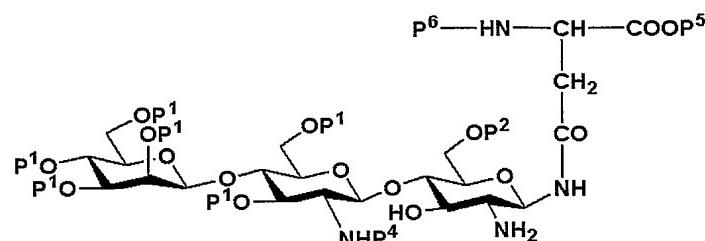
## 【化12】



(式中、 $P^1$ 、 $P^2$ 、 $P^3$  および  $P^{1\ 1}$  は前記と同意義)

で示される3糖化合物の還元末端に保護アスパラギンを結合させ、式 (V) :

## 【化13】

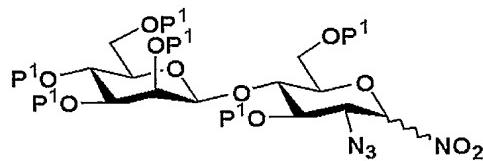


(式中、 $P^1$  および  $P^2$  は前記と同意義、 $P^4$  および  $P^6$  は各々独立してアミノ保護基、 $P^5$  はカルボキシ保護基である)

で示されるアスパラギン結合型3糖 ( $\text{Man} \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNP}^1 \beta 1 \rightarrow 4 \text{GlcNP}^2$ ) 化合物を製造する方法。

## 【請求項9】

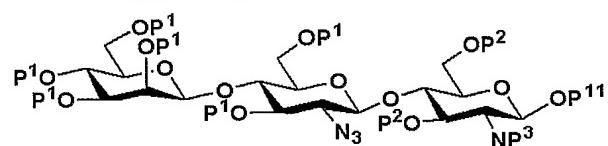
式(I I I)：  
【化14】



(式中、P<sup>1</sup>は水酸基の保護基であり、破線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)  
で示されるアジ化2糖(ManP<sup>1</sup>β1→4ManP<sup>1</sup>型)化合物。

## 【請求項10】

式(I V)：  
【化15】



(式中、P<sup>1</sup>、P<sup>2</sup>およびP<sup>1</sup><sup>1</sup>は水酸基の保護基、P<sup>3</sup>はアミノ保護基である)  
で示される3糖(Manβ1→4GlcNP<sup>1</sup>β1→4GlcNP<sup>2</sup>型)化合物。

【書類名】明細書

【発明の名称】アスパラギン結合型糖タンパク質コア糖鎖構造の合成

【技術分野】

【0001】

本発明は糖鎖化学合成の分野に属し、詳細には糖タンパク質糖鎖を簡便に化学合成するための方法およびそのための中間体に関する。

【背景技術】

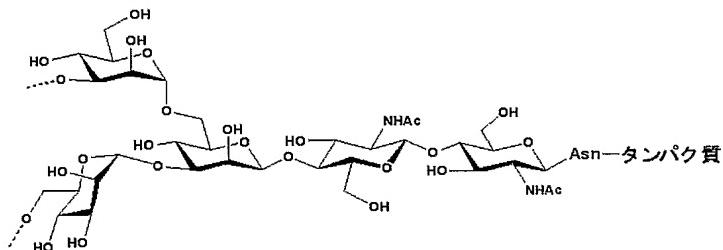
【0002】

糖タンパク質は、糖鎖と呼ばれるオリゴ糖部分を有するタンパク質である。

近年、糖タンパク質が生体内で細胞接着、情報伝達の現象に深く関わっている事が明らかにされつつあり、様々な生命現象を引き起こす糖鎖の構造が徐々にわかってきてている。しかし、生体内で糖鎖が機能する上で発現する量は微量であり、糖鎖の化学的、物理的性質を解明するほどの量を純粋に得ることは非常に難しい。

糖タンパク質のひとつであるアスパラギン結合型糖タンパク質は人の血清中や卵白アルブミンなどに幅広く存在する。このアスパラギン結合型糖鎖は、糖鎖構造の分岐および構成糖の特徴から高マンノース型、複合型および混合型に分類される。これらの型はすべて、マンノース3分子、N-アセチルグルコサミン2分子からなる共通する5糖のコア糖鎖構造を糖鎖の還元末端側にもっている：

【化1】



アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造

そのため、上記式で示されるコア糖鎖構造を化学的に合成することがアスパラギン結合型糖鎖の働きを調べる上で研究の基礎となる。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

しかし、このアスパラギン結合型糖鎖のコア糖鎖構造を化学的に合成するための効率的な手法は未だ存在していない。その理由としては、コア糖鎖構造には化学的に合成する上で非常に困難な部分を含んでいることが挙げられる。

コア糖鎖構造の化学的合成において、マンノース $\beta$ -グリコシド結合構造、すなわち $\beta$ -マンノグリコシド結合( $\text{Man} \beta 1 \rightarrow 4 \text{ GlcNAc}$ )を化学的に形成させることは非常に困難である。マンノースの2位の水酸基がアキシアル型に結合しているため、隣接基効果を利用できないこと、また $\beta$ -マンノグリコシド結合は、糖特有のアノマー効果に対して電気的に不安定な構造をとることが、その理由である。非特許文献1には $\beta$ -マンノグリコシド結合構造の化学的合成法が記載されているが、それは非常に複雑な工程を含み、時間およびコストを必要とする。

さらに、 $\beta$ -マンノグリコシド結合( $\text{Man} \beta 1 \rightarrow 4 \text{ GlcNAc}$ )の形成が困難である理由としては、グリコシル化反応時にアクセプターとなるN-アセチルグルコサミンの反応溶媒への溶解性が低いこと、また4位の水酸基の反応性が他の水酸基に比べて低いことが挙げられる(水酸基の反応性：1位 $\gg$ 6位 $\gg$ 2位 $>$ 3位 $>$ 4位)。

また、アスパラギン結合型糖鎖のコア糖鎖構造を化学的に合成する際には、 $\text{GlcNAc} \beta 1 \rightarrow 4 \text{ GlcNAc}$ 構造の合成についても問題点がある。

このようにアスパラギン結合型糖鎖のコア糖鎖構造を化学的に合成するには、特に還元

末端の3糖( $\text{Man} \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc} \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$ )の合成が、大きな問題として残っている。より効率的に、このコア糖鎖構造を合成するためには、特に $\beta$ -マンノグリコシド結合を効率的に合成するという問題を解決しなければならない。

#### 【0004】

【非特許文献1】Kunz, H. and Gunther, W. (1988) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 27, 1086-1087

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0005】

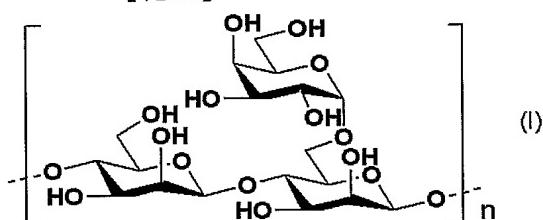
そこで、本発明者らはマンノース残基が $\beta 1 \rightarrow 4$ 結合で連なった構造を有する天然多糖、特にマンノース $\beta - 1, 4$ 結合を有するガラクトマンナン、グアガムおよびマンナンに着目した。すなわち、本発明ではコア糖鎖構造の合成において最大の難関となる $\beta$ -マンノグリコシド結合の形成に、天然多糖の構造中に含まれる $\text{Man} \beta 1 \rightarrow 4\text{Man}$ の2糖を利用するという新合成手法を用いる事により克服し、コア糖鎖構造の効率的合成法を確立することを目的とする。

#### 【0006】

すなわち、本発明は、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖( $\text{Man} \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcN} \beta 1 \rightarrow 4\text{GlcN}$ )を製造する方法において、

(1) マンノース $\beta - 1, 4$ 結合を有する多糖類、好ましくはマンノース $\beta - 1, 4$ 結合を有するガラクトマンナン、グアガムおよびマンナン、さらに好ましくは、式(I)：

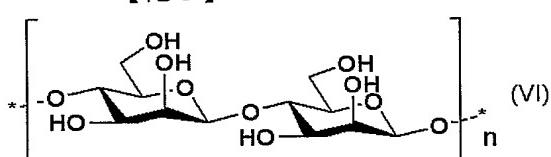
#### 【化2】



(式中、nは50以上の整数)

で示されるガラクトマンナン誘導体、または、式(VI)：

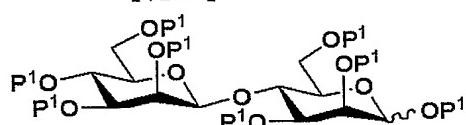
#### 【化3】



(式中、nは50以上の整数)

で示されるマンナン誘導体、を加水分解し、次いで得られた化合物の水酸基を保護することにより、式(II)：

#### 【化4】



(式中、P^1は水酸基の保護基であり、破線はOP^1基がアキシャル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

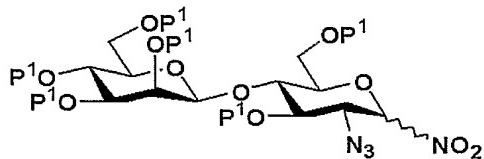
で示されるマンノース2糖( $\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{ManP}^1$ 型)化合物を製造する工程；

#### 【0007】

(2) 得られたマンノース2糖( $\text{ManP}^1 \beta 1 \rightarrow 4\text{ManP}^1$ 型)化合物をハロゲン化し、次いで還元することにより、マンノース2糖化合物における還元末端側のマンノースがグリカールに変換したグリカール化合物とし、次に、

(3) 得られたグリカール化合物をアジドナイトレーション反応に付し、還元末端側のマ

ンノースの2位にアジド基がエカトリアルに位置する式（III）：  
【化5】



(式中、P<sup>1</sup>は前記と同意義であり、破線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

で示されるアジ化2糖(ManP<sup>1</sup>β1→4ManP<sup>1</sup>型)化合物を製造する各工程；

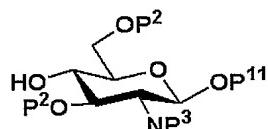
【0008】

(4) 得られたアジ化2糖(ManP<sup>1</sup>β1→4ManP<sup>1</sup>型)化合物のニトロ基を脱離基に置換し、好ましくは

(4-1) 得られたアジ化2糖(ManP<sup>1</sup>β1→4ManP<sup>1</sup>型)化合物のニトロ基を-O P<sup>1</sup><sup>0</sup>基に置換し、P<sup>1</sup><sup>0</sup>を脱保護した後、トリハロアセトニトリルを反応させ、トリハロアセトイミデート体とするか、または(4-2) 得られたアジ化2糖(ManP<sup>1</sup>β1→4ManP<sup>1</sup>型)化合物のニトロ基を脱離基で置換し、次いで

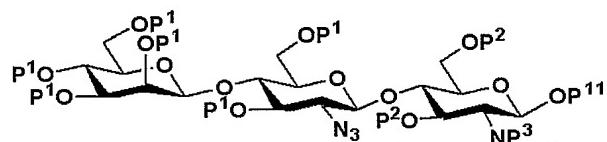
(5) 得られた脱離基導入体に式：

【化6】



(式中、P<sup>2</sup>は水酸基の保護基、P<sup>3</sup>はアミノ保護基、P<sup>1</sup><sup>1</sup>は水酸基の保護基である)  
で示されるアミノ保護グルコピラノシドを反応させ、式(IV)：

【化7】



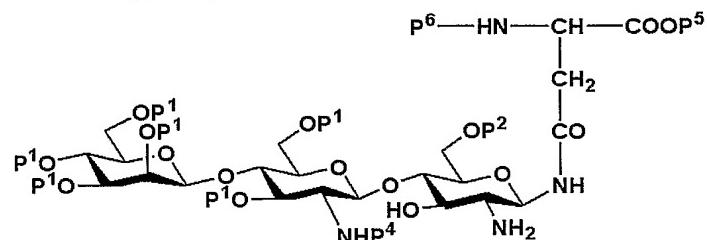
(式中、P<sup>1</sup>、P<sup>2</sup>、P<sup>3</sup>およびP<sup>1</sup><sup>1</sup>は前記と同意義)

で示される3糖(Manβ1→4GlcNP<sup>1</sup>β1→4GlcNP<sup>2</sup>型)化合物を製造する各工程；

【0009】

(6) 得られた3糖化合物の還元末端に保護アスパラギンを結合させ、式(V)：

【化8】



(式中、P<sup>1</sup>およびP<sup>2</sup>は前記と同意義、P<sup>4</sup>およびP<sup>6</sup>は各々独立してアミノ保護基、P<sup>5</sup>はカルボキシ保護基である)

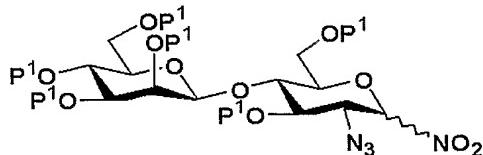
で示されるアスパラギン結合型3糖(Manβ1→4GlcNP<sup>1</sup>β1→4GlcNP<sup>2</sup>)化合物を製造する工程：

を含む方法、およびそれぞれの工程にかかる方法、ならびに：

【0010】

本発明の方法に有用な合成中間体である式(III)：

## 【化9】

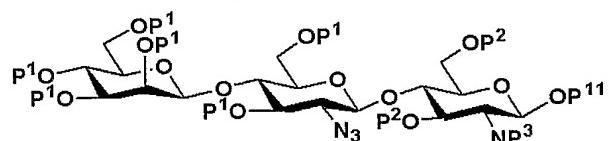


(式中、P<sup>1</sup>は水酸基の保護基であり、破線はニトロ基がアキシアル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)  
で示されるアジ化2糖 (ManP<sup>1</sup> β 1→4 ManP<sup>1</sup>型) 化合物、および

## 【0011】

式 (IV) :

## 【化10】



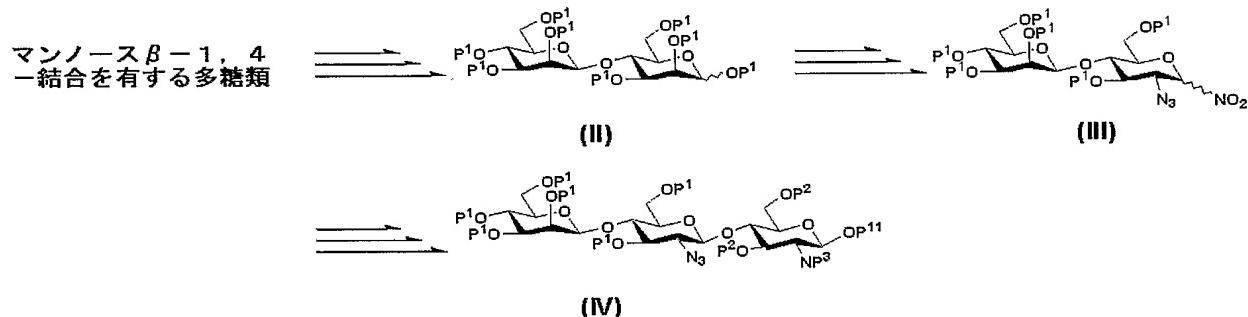
(式中、P<sup>1</sup>、P<sup>2</sup>およびP<sup>11</sup>は水酸基の保護基、P<sup>3</sup>はアミノ保護基である)  
で示される3糖 (Man β 1→4 GlcNP<sup>1</sup> β 1→4 GlcNP<sup>2</sup>型) 化合物：に関する。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0012】

本発明のコア糖鎖構造の新合成手法の概略を示すと次のとおりになる：

## 【化11】



(式中、破線はOP<sup>1</sup>基またはニトロ基が独立してアキシアル配置もしくはエカトリアル配置、または両配置が混在していることを示す)

## 【0013】

まず、マンノースβ-1, 4-結合を有する多糖類を酸加水分解後、アセチル化を行い、2糖である化合物(I I) Man β 1→4 Manを得る。次に、これを化学的手法により還元末端側のマンノースをグリカルールへ変換し、アジドナイトレーション反応を行い、化合物(I I I)に変換する。この還元末端側の2位にアジド基がエカトリアルに位置する化合物(I I I)は、コア糖鎖構造のMan β 1→4 GlcNAc部分へと変換できる有用な鍵中間体である。

このように、ガラクトマンナン、グアガムおよびマンナン誘導体から得られる化合物(I I)から、コア糖鎖構造の中でも最も合成困難であるMan β 1→4 GlcNAc構造へ変換可能である中間体(I I I)が安価かつ大量かつ簡単に合成できる。さらに、この中間体(I I I)をグリコシルドナーとして利用することにより、コア糖鎖構造の還元末端の3糖(Man β 1→4 GlcNAc β 1→4 GlcNAc)に容易に変換できる3糖構造の化合物(V)を合成する事ができる。

このようにして、非常に安価な天然多糖を利用することにより、コア構造の還元末端の3糖の合成を簡略化することに成功した。

## 【0014】

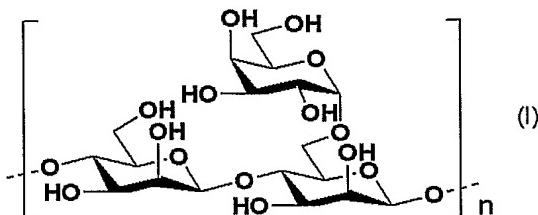
次に本発明方法の各工程について詳細に説明する。

## 工程 (1) :

工程1はマンノース $\beta$ -1, 4-結合を有する多糖類からマンノース2糖(ManP<sup>1</sup> $\beta$ 1→4ManP<sup>1</sup>型)化合物(I I)を製造する。まず、マンノース $\beta$ -1, 4-結合を有する多糖類を加水分解し、次いで水酸基を保護し、そして目的の2糖を分離する。

出発原料であるマンノース $\beta$ -1, 4-結合を有する多糖類としては、好ましくはマンノース $\beta$ -1, 4-結合を有するガラクトマンナン、グアガムおよびマンナンを使用し、さらに好ましくはさらに好ましくは、式(I)：

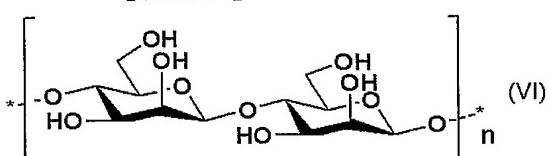
### 【化12】



(式中、nは50以上の整数)

で示されるガラクトマンナン誘導体、または、式(V I)：

### 【化13】



(式中、nは50以上の整数)

で示されるマンナン誘導体を使用する。

### 【0015】

ガラクトマンナン(galactomannnan)誘導体(ガラクトマンノグリカン(galactomanno glycan)とも呼ばれる)は、マメ科植物の種子をはじめとし、アルファルファやクローバーの実などに広く存在する。グアール(guar, Cyamopsis tetragonolobus)やイナゴマメ(carobまたはlocust bean, Ceratonia siliqua)の実のガラクトマンナンは植物ガム製品として市販されている。

グアール種子から取れる「グアガム」は、マンノースが $\beta$ 1→4結合で連なった直鎖状の糖鎖にマンノース1残基毎にガラクトースが $\alpha$ 1→6結合で分岐している天然多糖である。この物質の用途はほとんどが食品添加物であり、様々な缶詰製品の増粘剤として、食品の品質保持(型崩れ防止)や味の緩和剤として用いられており、簡単に入手可能かつ非常に安価である。

マンナン(mannan)誘導体は、D-マンノースから構成される多糖の総称である。ゾウゲヤシの種子胚乳、ラン科植物の球根などに含まれる植物マンナンはD-マンノース残基が $\beta$ 1→4結合で連なった直鎖構造を有し、水に難溶である。

これらは詳細には、「地域生物資源活用大辞典」 藤巻宏編(1998)農山漁村文化協会、Y. C. Lee, et al. (1977) Analytical Biochem., 79, 329-337およびShiryo Yaga, et al. (1995) Mokuzai Gakkaishi, vol41, No 4, 440-443に記載されている。

マンノース $\beta$ -1, 4-結合を有する多糖類の加水分解は通常、酸加水分解を行う。それには、通常、硫酸、好ましくは10-20%硫酸、トリフルオロ酢酸、硫酸-酢酸溶液を用い、反応温度は50-70℃が好ましい。

加水分解物中、70%エタノール可溶ガラクトマンナンを分離することにより、重合度「9」以上のものを除く。一般に、重合度が高くなれば、不溶画分に残る。

### 【0016】

水酸基の保護には通常、糖質化学の分野で利用されるアセチル基、ベンジル基、4-メトキシベンジル基、ベンゾイル基、メトキシメチル基、テトラヒドロピラニル基、トリメチルシリル基、トリエチルシリル基などである。

### 【0017】

2糖の分離は通常、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、および／または高速液体クロマトグラフィーにより行う。

#### 【0018】

工程2：

工程2はマンノース2糖(ManP<sup>1</sup>β1→4ManP<sup>1</sup>型)化合物(II)からグリカール化合物を製造する。まず、2糖化合物の還元末端側マンノースの1位をハロゲン化し、還元することによりグリカール化合物を製造する。

ハロゲン化は通常、ハロゲン化水素、酸ハロゲン化物等を用い、室温程度にて行う。還元は亜鉛等の金属を用いて行うが、高温は避ける。

#### 【0019】

工程3：

工程3はグリカール化合物をアジドナイトレーション反応に付し、還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエカトリアルに位置するアジ化2糖化合物(III)を製造する。

アジドナイトレーション反応は、アジド化とニトロ化とを同時に反応させて行う。この反応により、エカトリアルとアキシアルの混合物が生成されるので、それを分離精製することにより、還元末端側のマンノースの2位にアジド基がエカトリアルに配置された化合物を得る。

#### 【0020】

工程4：

工程4はアジ化2糖化合物のニトロ基を脱離基に置換する工程である。ここで使用する脱離基は、フッ素、臭素、塩素、トリクロロアセトイミデート、4-ペンテニル、アルキルチオ(硫黄)、アリールチオなどが一般的である。

好ましくは、アジ化2糖化合物のニトロ基を-O P<sup>1 0</sup>基に置換し、P<sup>1 0</sup>を脱保護した後、トリハロアセトニトリルを反応させ、トリハロアセトイミデート体とする。またはロゲン化水素を反応させてハロゲン体を得る。あるいは、-O P<sup>1 0</sup>体またはP<sup>1 0</sup>脱保護体は、ペンテニル体、アセチルチオ体、アリールチオ体などの脱離基導入体へと常法により変換してもよい。

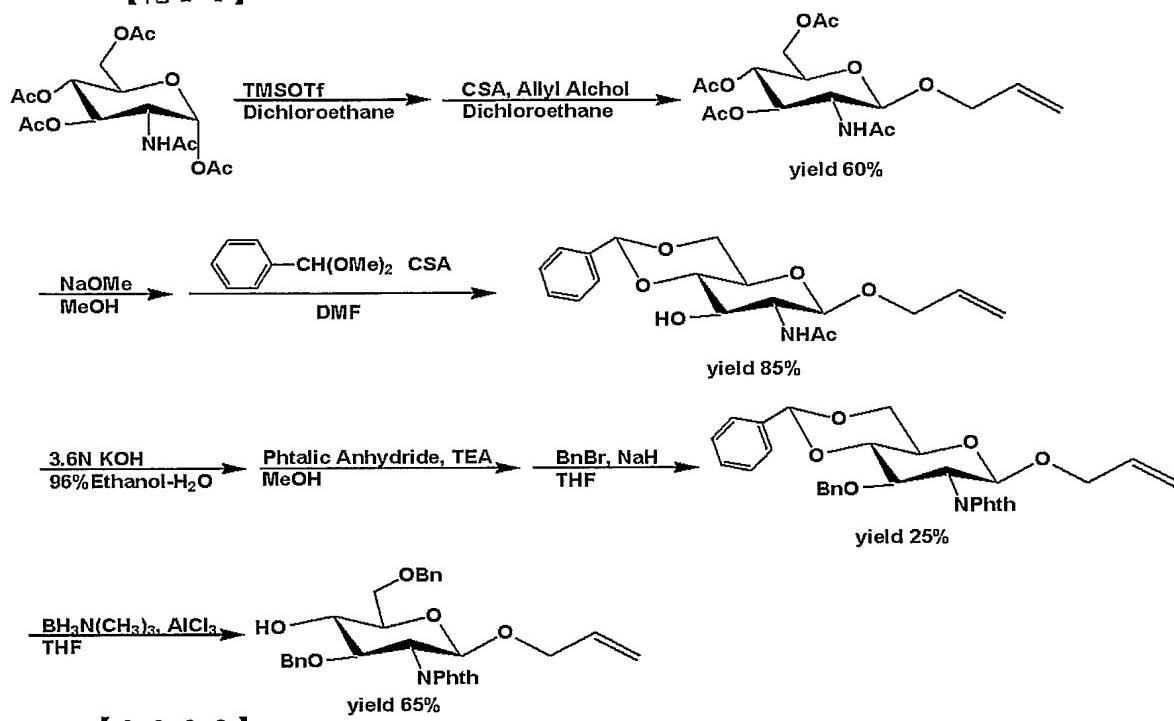
#### 【0021】

工程5：

工程5は得られた脱離基導入体にアミノ保護グルコピラノシドを反応させ、3糖(Manβ1→4GlcNP<sup>1</sup>β1→4GlcNP<sup>2</sup>型)化合物を製造する。

アミノ保護グルコピラノシドは次のスキームに従って製造できる。

## 【化14】



## 【0022】

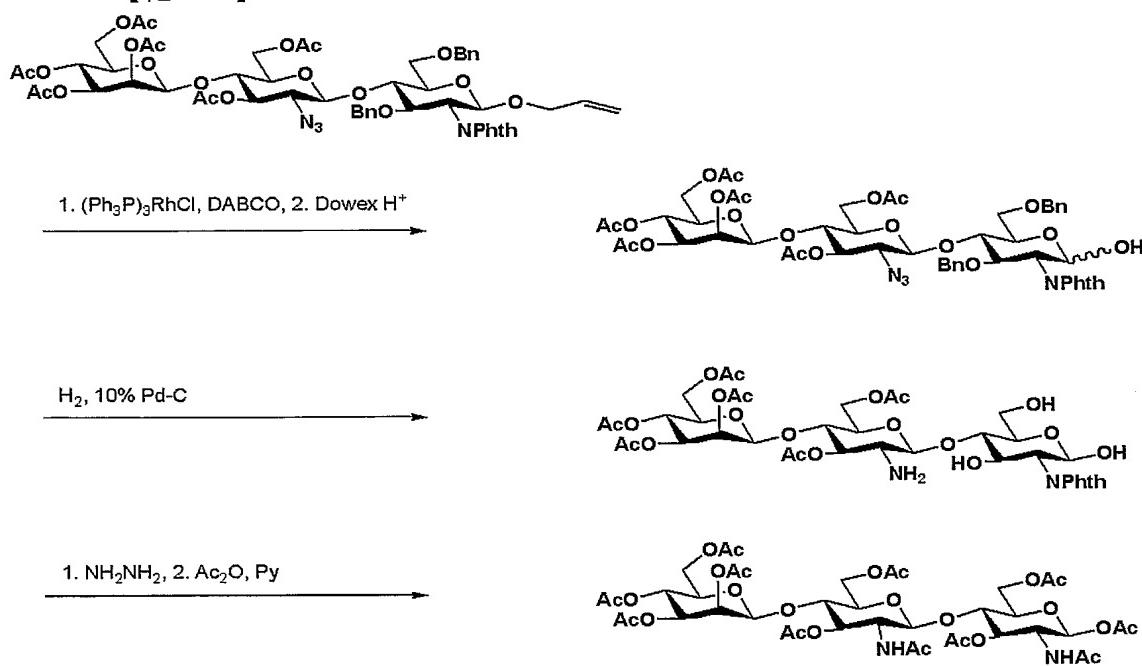
アミノ保護基としては通常、フタルイミド基、tert-ブチルオキシカルボニル基、ベンジルオキシカルボニル基、アセチル基、ベンゾイル基、ベンジル基などを利用する。次いで、これを得られた脱離基導入体と酸性（ルイス酸性）条件下、反応させる。

## 【0023】

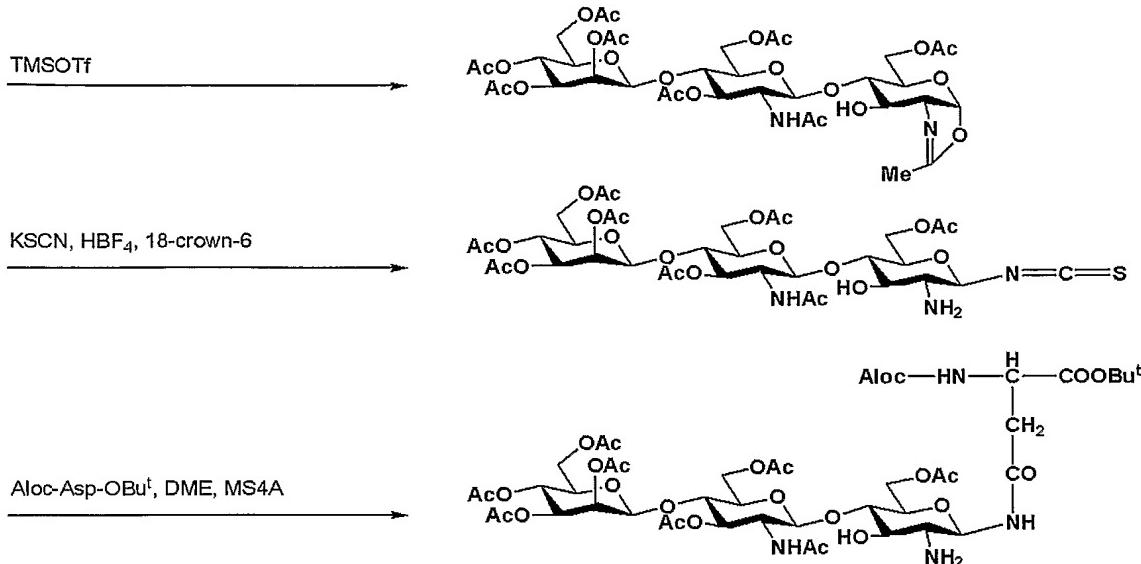
## 工程6：

工程6は、得られた3糖化合物にアスパラギンを結合させる。アスパラギンの結合は例えば、以下に示すスキームに従って行うことができる。

## 【化15】



## 【化16】



## 【0024】

上記のようにして合成した3糖を、目的タンパク質のアスパラギン残基に導入し、さらに新たな糖を付加させてその糖鎖を伸長させることができる。さらにあらかじめ3糖に対して糖鎖を伸長させた後にタンパク質に導入することもできる。

あるいは、得られたアスパラギン結合型3糖のアスパラギンに、通常のペプチド合成化学を応用すれば、タンパク質を伸張させることができる。また、非還元末端のマンノースに通常の糖質化学を応用すれば、糖鎖を伸張させることができる。

## 【実施例】

## 【0025】

以下に本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

実施例にて使用している試薬の入手先は次のとおりである。

- ・三晶株式会社(食品資材部)  
グアガム(Guargum)MEYPROGAT 120S
- ・関東化学株式会社  
亜鉛粉末(Zinc Powder)

硫酸銅5水和物(Copper(II) Sulfate Pentahydrate)(結晶粉末)

セリウム(IV)ジアンモニウムニトロート(Diammonium Cerium(IV) Nitrate)

## 【0026】

- ・和光純薬工業株式会社  
酢酸ナトリウム(Sodium Acetate)  
無水酢酸(Acetic Anhydride)  
トリフルオロ酢酸(Trifluoroacetic Acid)  
アジ化ナトリウム(Sodinium Azide)  
1,8-ジアザビシクロ[5, 4, 0]ウンデカ-7-エン(DBU、1,8-Diazabicyclo[5, 4, 0]undec-7-ene)  
トリクロロアセトニトリル(CCl<sub>3</sub>CN、Trichloroacetonitril)  
ホウ素トリフルオリドジエチルエーテルコンプレックス(BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>、Boron Trifluoride Diethyl Ether Complex)  
酢酸(Acetic Acid、有機合成用)  
ピリジン(Pyridine、有機合成用)  
テトラヒドロフラン(THF、Tetrahydrofuran、有機合成用)  
ジクロロメタン(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>、Dichloromethane、有機合成用)

アセトニトリル(Acetonitril、有機合成用)

酢酸エチル

クロロホルム

トルエン

無水MgSO<sub>4</sub>

トリエチルアミン

**【0027】**

・東京化成株式会社(食品資材部)

臭化水素 (30% HBr-AcOH, 30% Hydrogen Bromide in Acetic Acid)

**【0028】**

・ナカライトスク株式会社

ベンジルアミン(Benzylamine)

**【0029】**

・日本アルコール販売株式会社

99% エタノール

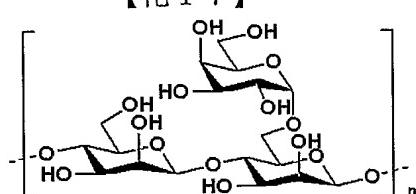
**【0030】**

実施例 1

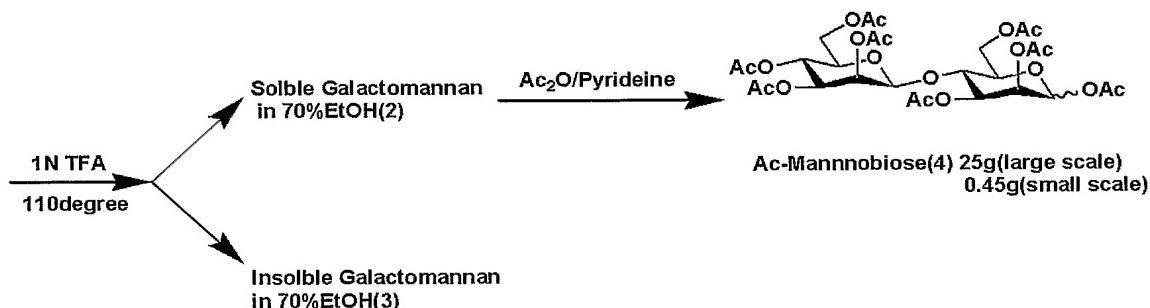
1. グアガムの加水分解およびMan  $\beta$  1→4Manの単離

合成スキーム (1)

**【化17】**



Guargum 200g(large scale)  
2.0g(small scale)



**【0031】**

1. 1. グアガムの加水分解(少量スケール)

(A) グアガムをトリフルオロ酢酸(TFA)で酸加水分解し、70%エタノール可溶ガラクトマンナン(Galactomannan)を得る。

グアガム(1)2.0gを1N TFA 16.6mlに溶解させ、オイルバス中で110°Cに加熱しながら、90分間スターラーを用いて攪拌した。反応溶液を、40mLの99%エタノールに加え、室温で静置すると、白い粉末が沈殿してくるのでブフナー漏斗を用いてろ過を行い、濾液を減圧下で濃縮した。この残渣をトルエンで数回共沸させ、70%エタノール可溶のガラクトマンナン(2) 2.26gと、70%エタノール不溶物のガラクトマンナン(3) 73mgを得た。

この70%エタノール可溶のガラクトマンナン(2)をMALDI-TOFMSにより測定したところ重合度1から8まで分解されていることを確認した。

**【0032】**

(B) 70%エタノール可溶のガラクトマンナンをアセチル化し、0-(2,3,4,6-テトラ- $\alpha$ -アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシリル)-(1→4)-1,2,3,6-テトラ- $\alpha$ -アセチル- $\alpha$ -and  $\beta$ -D-マン

ノピラノシド(4)を得る。

得られた70%エタノール可溶のガラクトマンナン(2)2.26gをピリジン23mlに溶解させ、氷冷中で無水酢酸23mlを加え、10°Cで22時間攪拌させた。反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO<sub>3</sub>水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄をした後、無水MgSO<sub>4</sub>を用いて乾燥させた。セライト濾過を用いてMgSO<sub>4</sub>を取り除き、濾液を減圧下で濃縮した。この残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液；トルエン/酢酸エチル=2:1)を用いて分離精製し、目的物(4)を450mg得た。

試料  $\alpha : \beta = 2:1$  混合物;  $[\alpha]D-0.5$  (c 0.012, クロロホルム); <sup>1</sup>H NMR  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) 1.99~2.19 (all s, 24H, 8COCH<sub>3</sub>), 3.64 (m, 1H, H-5'), 3.77 (m, 1/3H, H-5 $\beta$ ), 3.95~4.13 (m, 2+2/3H, H-5 $\alpha$ , H-4 $\beta$ , H-4 $\alpha$  and H-6'b), 4.23~4.37 (m, 3H, H-6b $\beta$ , H-6a $\alpha$ , H-6b $\alpha$ , H-6a' and H-6a $\beta$ ), 4.72 (d, 1/3H, J $^{\beta}$ <sub>1', 2'</sub>=1.1Hz, H-1 $\beta$ '), 4.75 (d, 2/3H, J $^{\alpha}$ <sub>1', 2'</sub>=1.1Hz, H-1 $\alpha$ '), 5.04 (m, 1H, H-3'), 5.17~5.25 (m, 2H, H-4', H-2 $\alpha$  and H-3 $\beta$ ), 5.39~5.45 (m, 2H, H-2', H-2 $\beta$  and H-3 $\alpha$ ), 5.81 (d, 1/3H, J $^{\beta}$ <sub>1, 2</sub>=1.1Hz, H-1 $\beta$ ), 6.03 (d, 2/3H, J $^{\alpha}$ <sub>1, 2</sub>=2.0Hz, H-1 $\alpha$ ).

理論値(C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>19</sub>として):C, 49.56; H, 5.64; 実測値:C, 49.34; H, 5.67

HR-FAB MS [M+Na]<sup>+</sup> 計算値(C<sub>28</sub>H<sub>38</sub>O<sub>19</sub>Naとして)701.191, 実測値 709.190

t.l.c ; Rf = 0.30 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

### 【0033】

#### 1. 2. ゲアガムの加水分解(大量スケール)

(A)' ゲアガムをTFAで酸加水分解し、70%エタノール可溶のガラクトマンナンを得る。

ゲアガム(1) 200gを1Nトリフルオロ酢酸(TFA) 1660mlに溶解させ、オイルバス中で110°Cに加熱しながら、35分間メカニカルスターを用いて攪拌した。ゲアガムが懸濁したところで、15分間超音波破碎を行い、110°C下で、メカニカルスターを用いて80分間攪拌した。反応溶液を、氷水で冷却した後、4Lの99%エタノールに加えた。室温で静置すると、白い粉末が沈殿してくるのでブフナー漏斗を用いてろ過を行い、濾液を減圧下で濃縮した。この残渣をトルエンで数回共沸させ、70%エタノール可溶のガラクトマンナン(2) 200.3gと、70%エタノール不溶物のガラクトマンナン(3) 9.9gを得た。

この70%エタノール可溶物のガラクトマンナン(2)をMALDI-TOFMSにより測定したところ重合度1から8まで分解されていることを確認した。

### 【0034】

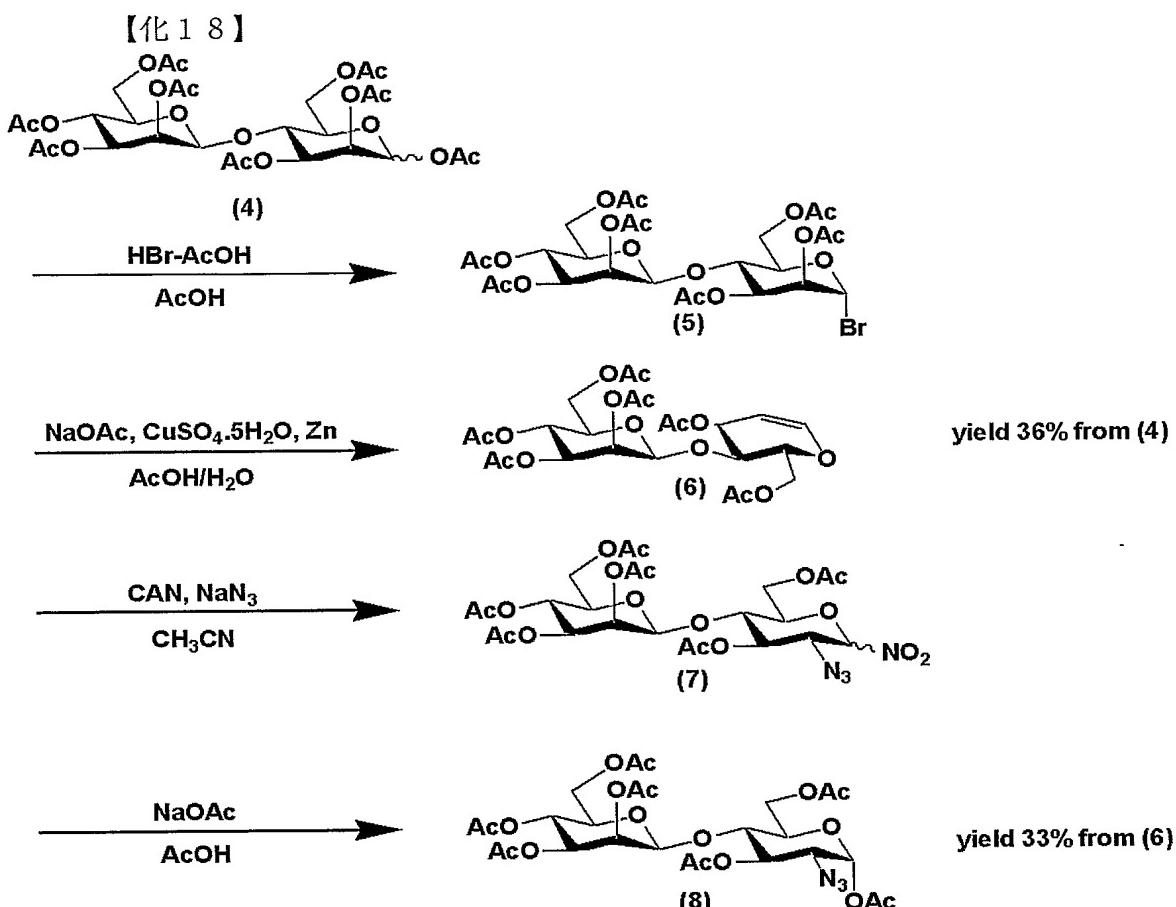
(B)' 70%エタノール可溶のガラクトマンナンをアセチル化し、0-(2,3,4,6,-テトラ-0-アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシル)-(1→4)-1,2,3,6,-テトラ-0-アセチル- $\alpha$ -and  $\beta$ -D-マンノピラノシド(4)を得る。

得られた70%エタノール可溶のガラクトマンナン(2)200.3gをピリジン2100mlに溶解させ、氷冷中で無水酢酸2100mlを加え、10°Cで22時間攪拌させた。反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO<sub>3</sub>水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄をした後、無水MgSO<sub>4</sub>を用いて乾燥させた。セライト濾過を用いてMgSO<sub>4</sub>を取り除き、濾液を減圧下で濃縮した。この残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液；トルエン/酢酸エチル=1:2)を用いて部分精製し、さらに中圧クロマトグラフィー(溶出液；トルエン/酢酸エチル=2:1)を用いて分離精製し、目的物(4)25.2gを得た。

### 【0035】

2. 0-(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシル)-(1→4)-1,3,6-トリ-0-アセチル-2-アジド-2-デオキシ- $\alpha$ -D-グルコピラノシド(8)の合成

合成スキーム (2)



## 【0036】

(C) O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシリル)-(1→4)-2,3,6-トリ-O-アセチル- $\alpha$ -D-マンノピラノシリル ブロミド (5)の合成

化合物(4)2.20gを酢酸19mlに溶解させ、氷冷中で30% HBr-AcOHを4.6ml加え遮光しながら室温で150分間攪拌した。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液に冰水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO<sub>3</sub>水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄した後に、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた。セライトろ過を用いてMgSO<sub>4</sub>を取り除き、ろ液を減圧下で濃縮し、目的物(5)を含む反応混合物を2.21g得た。

t.l.c.; Rf = 0.35 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

## 【0037】

(D) O-(2,3,4,6-テトラ-O-アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシリル)-(1→4)-, 3,6-ジ-O-アセチル-D-グリコール(6)の合成

氷冷中で、酢酸3.8ml、水7.6ml、酢酸ナトリウム2.06g、硫酸銅5水和物0.20g、亜鉛1.65gの順番で3つ口フラスコに、メカニカルスターラーを用いて攪拌しながら加えた。次に、化合物(5)を含む反応混合物を酢酸7.6mlに溶かし、氷冷中で反応溶液に加え、室温で遮光しながら4時間攪拌させた。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液をセライトろ過を用いて亜鉛を取り除き、ろ液に冰水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO<sub>3</sub>水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄した後に無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥した。セライトろ過を用いてMgSO<sub>4</sub>を取り除き、ろ液を減圧下で濃縮した。この残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液；トルエン/酢酸エチル=2:1)を用いて分離精製し、目的物(6)を0.64g得た。

化合物(4)からの収率： 36% ·

## 【0038】

<sup>1</sup>H NMR δ (CDCl<sub>3</sub>) .200, 2.05, 2.08, 2.10, 2.12 and 2.17(all s, 18H, 6COCH<sub>3</sub>), 3.66 (ddd, 1H, J<sub>4'</sub>, 5' = 9.8Hz, J<sub>5'</sub>, 6a' = 5.8Hz, J<sub>5'</sub>, 6 b' = 12.2Hz, H-5'), 4.05(dd, 1H,

$J_{3,4} = 6.0\text{Hz}$ ,  $J_{4,5} = 8.1\text{Hz}$ , H-4), 4.12(dd, 1H,  $J_{5',6b'} = 2.6\text{Hz}$ ,  $J_{6a'},6b' = 12.2\text{Hz}$ , H-6b'), 4.13-4.17(m, 1H, H-5), 4.23(dd, 1H,  $J_{5,6b} = 5.3\text{Hz}$ ,  $J_{6a,6b} = 12.2\text{Hz}$ , H-6b), 4.30(dd, 1H,  $J_{5',6a'} = 5.8\text{Hz}$ ,  $J_{6a',6b'} = 12.2\text{Hz}$ , H-6a'), 4.42(dd, 1H,  $J_{5,6a} = 2.9\text{Hz}$ ,  $J_{6a,6b} = 12.2\text{Hz}$ , H-6a), 4.79(dd, 1H,  $J_{1,2} = 6.1\text{Hz}$ ,  $J_{2,3} = 3.1\text{Hz}$ , H-2), 4.86(d, 1H,  $J_{1',2'} = 1.1\text{Hz}$ , H-1'), 5.05(dd, 1H,  $J_{2',3'} = 3.4\text{Hz}$ ,  $J_{3',4'} = 10.1\text{Hz}$ , H-3'), 5.22(t, 1H,  $J_{4',5'} = 9.8\text{Hz}$ , H-4'), 5.45(dd, 1H,  $J_{1',2'} = 1.1\text{Hz}$ ,  $J_{2',3'} = 3.4\text{Hz}$ , H-2'), 5.51(m, 1H, H-3), 6.40(dd, 1H,  $J_{1,2} = 6.1\text{Hz}$ , J<sub>double bond cis</sub> = 1.2Hz, H-1)

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) 20.5-21.0(m, 6COCH<sub>3</sub>), 61.8(C-6), 62.5(C-6'), 65.9(C-4'), 68.5(C-3 and C-2'), 70.8(C-3'), 72.6(C-5'), 74.0(C-4), 74.4(C-5), 97.9(C-1'), 99.0(C-2), 145.6(C-1), 169.5-170.6(m, 6COCH<sub>3</sub>)

t.l.c.; Rf = 0.40 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

## 【0039】

(E)0-(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシル)-(1→4)-3,6-di-0-アセチル-2-アジド-2-デオキシ  $\alpha$ -and  $\beta$ -D-グルコピラノシルニトレート(7)の合成

化合物(6) 510mgを脱水アセトニトリル 5.4mlに溶かし、-20°Cに冷やし、スターラーで攪拌した。この溶液に、アジ化ナトリウム(NaNaN<sub>3</sub>)89mgを加え、さらに、セリウム(IV)ジアンモニウムニトレート 1.50gを15分毎に4回に分けて加えた。反応溶液をヘリウム雰囲気下、-20°Cで18時間攪拌した。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO<sub>3</sub>水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄し、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた。セライトろ過を用いてMgSO<sub>4</sub>を取り除き、ろ液を減圧下で濃縮し、目的物(7)を含む残渣460mgを得た。

t.l.c.; Rf = 0.50 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

## 【0040】

(F)0-(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシル)-(1→4)-1,3,6-トリ-0-アセチル-2-アジド-2-デオキシ- $\alpha$ -D-グルコピラノシド(8)の合成

化合物(7)を含む反応混合物の残渣 460mgを酢酸 2.0mlに溶かし、酢酸ナトリウム 170mgを加え、80°Cのオイルバス中で75分間攪拌した。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、NaHCO<sub>3</sub>水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄し、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた。セライトろ過を用いてMgSO<sub>4</sub>を取り除き、ろ液を減圧下で濃縮した。この残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液；トルエン/酢酸エチル = 3 : 2)を用いて分離精製し、目的物(8)と0-(2,3,4,6-テトラ-0-アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシル)-(1→4)-1,3,6-トリ-0-アセチル-2-アジド-2-デオキシ- $\alpha$ -D-マンノピラノシド(9)を含む残渣360mg得た。この混合物を少量のエタノールに熱しながら溶かし、氷水で冷やしながら結晶化させた。これにより、目的物(8)を 201mmg得た。

t.l.c.; Rf = 0.39 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

化合物(6)からの収率： 33%。

## 【0041】

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) 1.99, 2.05, 2.10, 2.12, 2.17 and 2.20 (all s, 21H, 7COCH<sub>3</sub>), 3.51(dd, 1H,  $J_{1,2} = 3.8\text{Hz}$ ,  $J_{2,3} = 10.5\text{Hz}$ , H-2), 3.61(dd, 1H,  $J_{4',5'} = 9.9\text{Hz}$ ,  $J_{5',6a'} = 5.0\text{Hz}$ ,  $J_{5',6b'} = 2.8\text{Hz}$ , H-5'), 3.83(t, 1H,  $J_{4,5} = 10.2\text{Hz}$ , H-4), 3.99(m, 1H, H-5), 4.12(dd, 1H,  $J_{5',6b'} = 2.8\text{Hz}$ ,  $J_{6a',6b'} = 12.3\text{Hz}$ , H-6b'), 4.24(dd, 1H,  $J_{5,6b} = 3.7\text{Hz}$ ,  $J_{6a,6b} = 12.5\text{Hz}$ , H-6b), 4.30(dd, 1H,  $J_{5,6a} = 2.8\text{Hz}$ ,  $J_{6a,6b} = 12.5\text{Hz}$ , H-6a) 4.38(dd, 1H,  $J_{5,6a} = 2.8\text{Hz}$ ,  $J_{6a,6b} = 12.5\text{Hz}$ , H-6a), 4.66(d, 1H,  $J_{1',2'} = 0.6\text{Hz}$ , H-1'), 5.03(dd, 1H,  $J_{2',3'} = 3.2\text{Hz}$ ,  $J_{3',4'} = 9.9\text{Hz}$ , H-3'), 5.23(t, 1H,  $J_{4',5'} = 9.9\text{Hz}$ , H-4'), 5.42(dd, 1H,  $J_{1',2'} = 0.6\text{Hz}$ ,  $J_{2',3'} = 3.2\text{Hz}$ , H-2'), 5.43(dd, 1H,  $J_{2',3'} = 10.5\text{Hz}$ ,  $J_{3',4'} = 9.3\text{Hz}$ , H-3), 6.24(d, 1H,  $J_{1,2} = 3.8\text{Hz}$ , H-1)

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) 20.5-20.9(m, 6COCH<sub>3</sub>), 60.3(C-2), 61.9(C-6), 62.2(C-6'), 65.8(C-4'), 68.1(C-2'), 69.7(C-3), 70.4(C-5), 70.7(C-3'), 72.5(C-5'), 74.0(C-4), 89.9(C-1), 97.5(C-1'), 168.6-170.4(m, 6COCH<sub>3</sub>)

理論値(C<sub>26</sub>H<sub>35</sub>O<sub>17</sub>として): C, 47.20; H, 5.33; N, 6.35; 実測値: C, 46.90; H, 5.32;

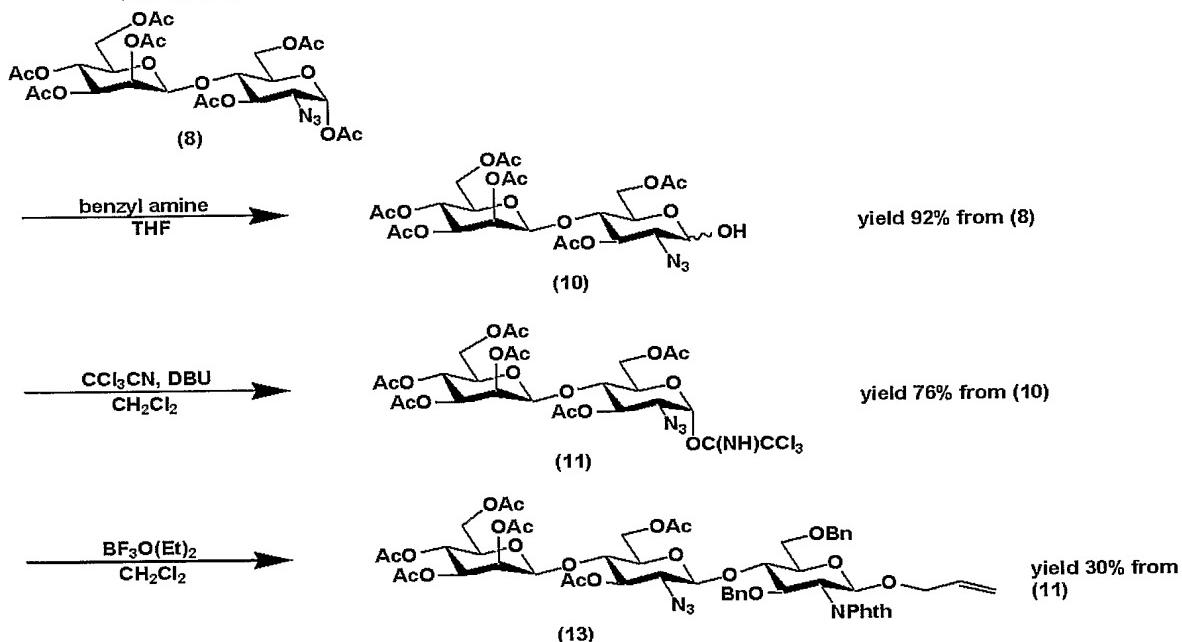
N, 6.39.

HR-FAB MS [M+H]<sup>+</sup> 計算値 ( $C_{26}H_{36}N_3O_{17}$  として) 662.205, 実測値 662.202  
mp+183.5-184.0°C (エタノールから),  
t.l.c.; Rf = 0.39 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

**【0042】**

3. アリル O-(2, 3, 4, 6-テトラ-0-アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシル)-(1→4)-O-(3, 6-ジ-0-アセチル-2-アジド-2-デオキシ- $\beta$ -D-グルコピラノシル)-(1→4)-3, 6-ジ-0-ベニジル2-デオキシ-2-フタルイミド- $\beta$ -D-グルコピラノシド(13)の合成  
合成スキーム (3)

**【化19】**



**【0043】**

(G) O-(2, 3, 4, 6-テトラ-0-アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシル)-(1→4)-3, 6-ジ-0-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-D-グルコピラノース (10)の合成

化合物(8)300mgをTHF 3.0mlに溶解させ、氷冷中でベンジルアミン  $89\mu l$  を加え、室温で48時間攪拌した。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液に氷水を加え、クロロホルムを用いて抽出し、水、1N.HCl水溶液、NaCl水溶液の順で洗浄し、無水MgSO<sub>4</sub>で乾燥させた。セライトろ過を用いてMgSO<sub>4</sub>を取り除き、ろ液を減圧下で濃縮した。この残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液；トルエン/酢酸エチル=3:2)を用いて分離精製し、目的物(10)を257mg得た。

化合物(8)からの収率： 92%。

HR-FAB MS [M+H]<sup>+</sup> 計算値 ( $C_{24}H_{34}N_3O_{16}$  として) 620.194 ; 実測値 620.192。

t.l.c ; Rf = 0.26 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

**【0044】**

(H) O-(2, 3, 4, 6-テトラ-0-アセチル- $\beta$ -D-マンノピラノシル)-(1→4)-3, 6-ジ-0-アセチル-2-アジド-2-デオキシ- $\alpha$ -D-グルコピラノシル トリクロロアセトイミドート(11)の合成

化合物(10)85mgを $CH_2Cl_2$  550 $\mu l$  と  $CCl_3CN$  275 $\mu l$  に溶解させ、氷冷中でDBU 10.2 $\mu l$  を加え、室温で2時間攪拌した。反応終結をTLCで確認した後、反応溶液を減圧下で濃縮した。この残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液；トルエン/酢酸エチル=2:1)を用いて分離精製し、目的物(11)を80mg得た。

化合物(10)からの収率： 76%。

**【0045】**

<sup>1</sup>H NMR δ (CDCl<sub>3</sub>) 1.97, 2.02, 2.07, 2.08, 2.16 and 2.17(all s, 18H, 6COCH<sub>3</sub>), 3.5 6-3.60(m, 1H, H-5'), 3.60(dd, 1H, J<sub>1</sub>, 2=3.4Hz, J<sub>2</sub>, 3=10.5Hz, H-2), 3.88(t, 1H, J 4, 5=9.8Hz, H-4), 4.09(dd, 1H, J<sub>5'</sub>, 6<sub>b</sub>'=2.7Hz, J<sub>6a'</sub>, 6<sub>b</sub>'=12.5Hz, H-6b'), 4.09-4.14(m, 1H, H-5), 4.21(dd, 1H, J<sub>5</sub>, 6<sub>b</sub>=3.9Hz, J<sub>6a</sub>, 6<sub>b</sub>=12.5Hz, H-6b), 4.33(dd, 1H, J 5, 6<sub>a</sub>=2.2Hz, J<sub>6a</sub>, 6<sub>b</sub>=12.5Hz, H-6a), 4.33(dd, 1H, J<sub>5'</sub>, 6<sub>a</sub>'=4.9Hz, J<sub>6a'</sub>, 6<sub>b</sub>'=12.5Hz, H-6a'), 4.69(s, 1H, H-1'), 5.01(dd, 1H, J<sub>2'</sub>, 3'=3.4Hz, J<sub>3'</sub>, 4'=10.0Hz, H-3'), 5.20(t, 1H, J<sub>4'</sub>, 5'=9.8Hz, H-4'), 5.38(d, 1H, J<sub>2'</sub>, 3'=3.4Hz, H-2'), 5.51(dd, 1H, J<sub>2</sub>, 3=10.5Hz, J<sub>3</sub>, 4=9.5Hz, H-3), 6.41(d, 1H, J<sub>1</sub>, 2=3.4Hz, H-1), 8.79(s, 1H, NH )

<sup>13</sup>C NMR δ (CDCl<sub>3</sub>) 20.5-20.7(m, 6COCH<sub>3</sub>), 60.8(C-2), 61.9(C-6), 62.3(C-6'), 65.8(C -4'), 68.2(C-2'), 69.3(C-3), 70.7(C-5 and C-3'), 72.6(C-5'), 74.1(C-4), 90.5(C(N H)CCl<sub>3</sub>), 94.1(C-1), 97.3(C-1'), 160.6(C(NH)CCl<sub>3</sub>), 169.5-170.4(m, 6COCH<sub>3</sub>)

t.l.c ; Rf = 0.37 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

#### 【0046】

(I) アリル 0-(2, 3, 4, 6-テトラ-0-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-0-(3, 6 -ジ-0-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-β-D-グルコピラノシル)-(1→4)-3, 6-ジ-0-ベンジル2-デオキシ-2-フタルイミド-β-D-グルコピラノシド(13)の合成

化合物(11)47mgとアリル-0-3, 6-0-ジ-ベンジル-2-デオキシ-2-フタルイミド-β-D-グルコピラノシド(12)45mgをCH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 700μlに溶解させ、MS4 Å (モレキュラーシーブス) を70mg加え、窒素雰囲気下、-20°Cで30分攪拌した。

次に、BF<sub>3</sub>OEt<sub>2</sub>を2.3μl加え、窒素雰囲気下、-20°Cで24時間攪拌した。反応終結をTLCで確認した後、トリエチルアミン(TEA)を加え中和した後、セライトろ過を用いてMS4 Åを取り除き、ろ液を減圧下で濃縮した。この残渣をフラッシュシリカゲルクロマトグラフィー(溶出液；トルエン/酢酸エチル = 5:2)を用いて部分精製し、目的物(13)とアリル 0-(2, 3, 4, 6-テトラ-0-アセチル-β-D-マンノピラノシル)-(1→4)-0-(3, 6-ジ-0-アセチル-2-アジド-2-デオキシ-α-D-グルコピラノシル)-(1→4)-3, 6-ジ-0-ベンジル2-デオキシ-2-フタルイミド-β-D-グルコピラノシドを含む残渣32mgを得た(α; β=1:2)。さらにHPLC(溶出液；ヘキサン/エタノール=12:1)を用いて分離精製し、目的物(13)を21mg得た。

化合物(11)からの収率： 31%。

#### 【0047】

<sup>1</sup>H NMR δ (CDCl<sub>3</sub>) 1.90, 1.92, 1.96, 2.00, 2.07, 2.15(all s, 18H, 6COCH<sub>3</sub>), 3.08(m, 1H, H-5'), 3.27(dd, 1H, J<sub>1'</sub>, 2'=8.1Hz, J<sub>2'</sub>, 3'=10.2Hz, H-2'), 3.46(dd, 1H, J<sub>4''</sub>, 5''=9.9Hz, J<sub>5''</sub>, 6<sub>a''</sub>=4.8Hz, J<sub>5''</sub>, 6<sub>b''</sub>=2.6Hz, H-5''), 3.51-3.56(m, 1H, H-5), 3.56(t , 1H, J<sub>4'</sub>, 5'=9.8Hz, H-4'), 3.76(dd, 1H, J<sub>5</sub>, 6<sub>b</sub>=1.4Hz, J<sub>6a</sub>, 6<sub>b</sub>=10.9Hz, H-6b), 3.87(dd, 1H, J<sub>5</sub>, 6<sub>a</sub>=2.9Hz, J<sub>6a</sub>, 6<sub>b</sub>=10.9Hz, H-6a), 3.91(dd, 1H, J=6.3Hz, J=13.0Hz, CHH'CH=CH<sub>2</sub>), 3.98-4.20(m, 7H, H-6b'', H-4, H-2, H-6a', H-3, CHH'CH=CH<sub>2</sub>), 4.27 and 4.66(ABq, 2H, J=1 2.5Hz, PhCH<sub>2</sub>), 4.30(d, 1H, J<sub>1'</sub>, 2'=8.1Hz, H-1'), 4.42 and 4.73(ABq, 2H, J=12.0Hz , PhCH<sub>2</sub>), 4.45(s, 1H, H-1''), 4.76(dd, 1H, J<sub>2'</sub>, 3'=3.4Hz, J<sub>3'</sub>, 4'=9.9Hz, H-3''), 4 .92(dd, 1H, J<sub>2''</sub>, 3''=3.4Hz, J<sub>3''</sub>, 4''=9.9Hz, H-3''), 4.93(dd, 1H, J=1.5Hz, J<sub>trans</sub>=10 .4Hz, CH=CH<sub>trans</sub>H), 4.93(dd, 1H, J=1.5Hz, J<sub>cis</sub>=17.2Hz, CH=CH<sub>cis</sub>), 5.06(d, 1H, J<sub>1,2</sub>=8.4Hz, H-1), 5.14(t, 1H, J<sub>4''</sub>, 5''=9.9Hz, H-4''), 5.30(d, 1H, J<sub>2''</sub>, 3''=3.4Hz, H-2''), 5.60(m, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 6.70-7.58(m, 14H, Ar-H)

<sup>13</sup>C NMR δ (CDCl<sub>3</sub>) 20.5-20.6(m, 6COCH<sub>3</sub>), 55.5(C-2), 62.2(C-6' and C-6''), 64.5(C-2 '), 65.9(C-4''), 67.8(C-6), 68.1(C-2''), 69.7(CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 70.7(C-3''), 71.9(C-3''), 72.0(C-5'), 72.5(C-5''), 73.5 and 74.3(2PhCH<sub>2</sub>), 74.6(C'-4 and C-5), 78.2(C-4), 97 .3(C-1 and C-1''), 100.8(C-1''), 117.3(CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 127.0-133.7(m, 18Ar-C), 137.9(C H<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 169.6-170.4(m, 8C=O)

HR-FAB MS [M+Na]<sup>+</sup> 計算値(C<sub>55</sub>H<sub>62</sub>N<sub>4</sub>O<sub>22</sub>Naとして).1153.375, 実測値 1153.374

t.1.c ; Rf = 0.53 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

【0048】

(J) (グリコシル アクセプターデータ) アリル-0-3, 6-ジ-0-ベンジル-2-デオキシ-2-フタルイミド- $\beta$ -D-グルコピラノシド(12)

$^1\text{H}$  NMR  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) 3.63(m, 1H, H-5), 3.76-3.85(m, 3H, H-4, H-6a and H-6b), 3.97(dd, 1H, J=13.1Hz, J=6.1Hz, CHH'CH=CH<sub>2</sub>), 4.15-4.26(m, 3H, H-2, H-3 and CHH'CH=CH<sub>2</sub>), 4.52 and 4.73(ABq, 2H, J=12.2Hz, PhCH<sub>2</sub>), 4.58 and 4.64(ABq, 2H, J=11.9Hz, PhCH<sub>2</sub>), 4.99(dd, 1H, J=1.3Hz, J<sub>trans</sub>=10.3Hz, CH=CHcisHtrans), 5.07(dd, 1H, J=1.3Hz, J<sub>cis</sub>=17.2Hz, CH=CHcisHtrans), 5.17(d, 1H, J<sub>1,2</sub>=8.1Hz, H-1), 5.61-5.70(m, 1H, CH=CH<sub>2</sub>), 6.93-7.67(m, 14H, Ar-H)

$^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  (CDCl<sub>3</sub>) 55.3(C-2), 69.7(C-C=C), 70.7(C-6), 73.5(C-5), 73.8 and 74.3(Ph-C), 74.5(C-4), 78.7(C-3), 97.4(C-1), 117.3(C-C=C), 127.4-128.5(m, Ar-C), 133.6(C-C=C), 137.6 and 138.2(C=O)

HR-FAB MS [M+H]<sup>+</sup> 計算値(C<sub>31</sub>H<sub>32</sub>NO<sub>7</sub>として) 530.218, 実測値 530.215

t.1.c ; Rf = 0.72 (トルエン/酢酸エチル = 1:1)

【産業上の利用可能性】

【0049】

糖鎖において糖を新たに付加して伸張させる場合、糖転移酵素を利用すれば簡便であるため、糖鎖の自動合成は通常、付加する糖とその糖を付加するための糖転移酵素が使用される。しかし、アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖(Man  $\beta$  1→4GlcN  $\beta$  1→4GlcN)部分を作るための糖転移酵素は存在していない。従ってその合成は化学合成法に頼らざるを得ない。

本発明は、非常に安価な天然多糖であるマンノース  $\beta$ -1, 4-結合を有するガラクトマンナン、グアガムおよび/またはマンナン誘導体を利用することによる、コア構造の還元末端3糖の簡便な合成方法である。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】 アスパラギン結合型糖タンパク質糖鎖のコア糖鎖構造における還元末端の3糖部分を化学的に合成する。

【解決手段】 非常に安価なマンノース $\beta-1,4$ -結合を有する天然多糖を出発原料として利用し、マンノースの $\beta 1 \rightarrow 4$ グリコシド結合を形成させる。

【選択図】なし

特願 2003-433717

出願人履歴情報

識別番号 [000001926]

1. 変更年月日 1990年 8月23日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番8号  
氏名 塩野義製薬株式会社